

利用 RAPD 技术鉴别玉米自交系 *

赵久然 郭景伦 孔艳芳* 尉德铭 郭强

(北京市农林科学院玉米研究中心, 北京 100081)

Identification of Maize Inbred Lines with Random Amplified Polymorphic DNA(RAPD)

Zhao jiuran Guo jinglun Kong yanfang Yu Deming Guo qiang

(Beijing Academy of Agricultural and Forestry Sciences, Beijing, 100081)

Abstract: 28 main maize inbred lines were analysed by using RAPD technology. 40 primers which amplified polymorphic bands were screened from 300 primers. The results illustrated that 15 inbreds were identified using the primer OPI10, and 26 inbred lines could be distinguished by adding primer OPB07. If any of the primers OPC19, OPC6, OPA7, OPG14 Was added, 28 inbreds were able to be completely identified. The experiment also showed that the close relative inbred lines such as 478, 488 with 3189, and Shuang 105 with shuang 741, which could not be distinguished by isoenzyme, could be identified obviously using RAPDs. The study demonstrated that it was practical and effective to identify maize inbreds with RAPDs.

Key words: Maize (*Zea mays* L.); Inbred line; Identification; RAPD

摘 要 本文利用 RAPD 技术对我国 28 个玉米骨干自交系进行了分析, 从 300 个引物中筛选出了 40 个多态性好的引物, 结果发现: 仅使用 OPI₁₀ 一个引物扩增的 DNA 指纹图谱就能区别开 15 个自交系, 增加引物 OPB₇ 可以区分开 26 个自交系, 再增加 OPC₁₉、OPC₆、OPA₇、OPI₁₁、OPG₁₄ 中的任何一个引物就可以将 28 个自交系完全区分开。研究还表明亲缘关系很近、利用同工酶方法无法区分的姊妹系材料如: 478、488 和 3189, 以及双 105 和双 741 都能够被明显的区分开, 证明了利用 RAPD 技术进行玉米自交系鉴定完全可行而且是非常有效的。

关键词 玉米 自交系 鉴别 RAPD

对玉米自交系的鉴别, 最初采用形态学方法, 但可用于鉴别的形态特征数目有限, 且易受环境因素的影响, 所以仅靠简单的形态学方法来进行鉴别是不可靠的。现在应用比较多的是同工酶电泳技术, 它在品种鉴定中确实发挥了一定的作用。但由于同工酶是基因表达的产物, 一定程度上受到环境因素的影响, 所能提供的标记数目有限, 不能区分亲缘关系很近的品种, 尤其在遗传基础越来越狭窄的今天, 该方法更表现出了其局限性。80 年代发展起来了一种直接从 DNA 水平来揭示遗传多态性的分子标记 RFLP, 该方法多态性丰富, 不受环境条件影响, 但由于其操作繁琐、耗时长、成本高、通常使用同位素标记、有放射性污染, 不适合大量样品分析。

* 孔艳芳: 河北农业大学在读硕士研究生。

本项目为北京市科委资助, 并被列为国家科委地方重点攻关项目。

收稿日期 1998-08-13

1990年 Williams^[8]和 Welsh^[7]等发展的一种新的分子生物学技术—RAPD,它是以 PCR 技术为基础,通过随机引物的扩增来检测 DNA 的多态性。相比之下,RAPD 技术用于大量自交系的鉴定独具特色:(1)样品用量少,每次只需 10~50ng DNA;(2)不受环境条件和发育阶段的影响;(3)多态性极丰富,可选用的引物 700 多种,克服了蛋白质、同工酶技术的缺点;(4)操作简单、经济快捷、无放射性污染,避免了 RFLP 的不足,所以该方法可以有效的用于品种鉴定上。Hu^[5]利用 RAPD 对 Brassica 属作物进行了鉴定。余四斌^[4]等对利用 RAPD 技术鉴定水稻种子纯度进行了探讨,发现 RAPD 扩增结果与田间实验一致。刘新芝等^[3]通过 RAPD 方法对 15 个自交系进行了分析,将其进行类群划分的结果与系谱法一致。McDonald^[6]等人从玉米、棉花、大豆、小麦和红三叶草的干种子中提取 DNA 并成功的进行了 RAPD 扩增。但其只对玉米扩增出了一条谱带。利用 RAPD 技术进行玉米自交系鉴定的研究尚未见报导。本研究以玉米自交系为材料目的在于研究:(1)是否可以利用 RAPD 技术鉴定玉米自交系;(2)蛋白质、同工酶技术无法区分的材料是否可以利用 RAPD 方法加以区分;(3)建立一套简单可靠的反应体系,以期能够系统化的进行分析。

1 材料与方法

1.1 供试材料及编号

本研究所选用的 28 个自交系均采用人工套袋的方法进行严格田间选择提纯,并经过 2 年田间观察,证实其纯合稳定整齐一致,其名称及编号(表 1)。

表 1 供试自交系名称及编号

编 号	自交系	编 号	自交系	编 号	自交系
1	478	10	196	19	B 尖 8
2	488	11	81515	20	直 25
3	3189	12	获唐黄	21	直 29
4	5005	13	丹 340	22	P78
5	掖 107	14	E28	23	501
6	黄早 4	15	52106	24	167
7	四自 4	16	双 105	25	Z5
8	吉 853	17	双 741	26	145
9	H21	18	7922	27	Mo17
				28	武 314

1.2 实验方法

1.2.1 DNA 提取

采用郭景伦^[1]等改进的玉米单粒种子 DNA 提取新方法:将干种子的胚剥下,放入 1.5 mL 的离心管中,加入 100μL 氯仿后研磨,然后加入 300 μL DNA 提取液(100 mmol·L⁻¹ Tris-HCl, 100 mmol·L⁻¹ EDTA, 500 mmol·L⁻¹ NaCl, 1.5% SDS)混均后于 10 000 r/min 离心 2 min,吸上清液加入预先装有 500 μL 无水乙醇的 1.5 mL 离心管中,轻轻来回倒置 2 次,12 000 r/min 离心 1 min,倒掉上清液,加 70%乙醇洗涤,空气干燥后直接加入 100 μL TE 待充分溶解后备用。

1.2.2 随机引物

本实验所采用的随机引物为美国 Operon 公司生产的,长度为 10 bp,编号从 OPA₀₁-OPO₂₀,共计 300 个引物。

1.2.3 RAPD 扩增反应体系

每 25 μL 反应液其中包括: 10 $\text{mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ Tris - HCl (pH8.0), 50 $\text{mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ KCl, 2 $\text{mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ MgCl_2 , 明胶 0.001%, 4 $\times$ dNTPs 分别为 0.2 $\text{mmol} \cdot \text{L}^{-1}$, 引物 1 $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$, 1.5 单位 TaqDNA 聚合酶, 20ng DNA 模版。

1.2.4 RAPD 扩增程序

该反应是在 PTC - 100 PCR 反应仪上进行的。DNA 扩增程序为: 94 $^{\circ}\text{C}$ 预变性 1 min, 94 $^{\circ}\text{C}$ 变性 20 s, 37 $^{\circ}\text{C}$ 引物与模板结合 1 min, 72 $^{\circ}\text{C}$ 延伸 1.5 min, 共 40 个循环, 完成最后一个循环后, 72 $^{\circ}\text{C}$ 保温 5 min, 使其延伸更完全。

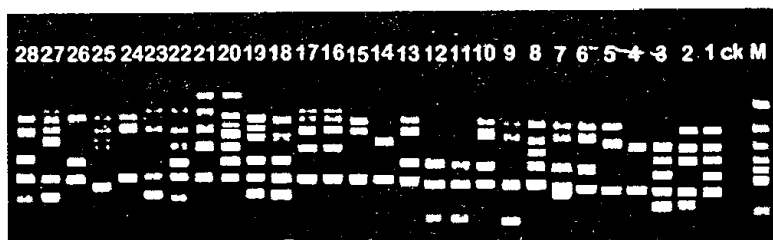
1.2.5 电泳分析

RAPD 扩增产物用 1.2% 琼脂糖凝胶分离, 溴化乙锭染色, 紫外灯下观察照相。

2 结果与分析

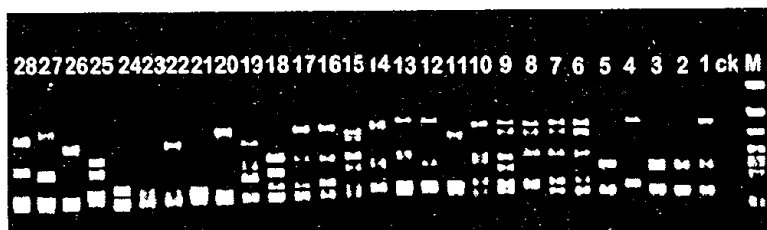
2.1 自交系间的多态性

本研究从 300 个引物中筛选出对玉米扩增能得到多态性产物的引物 40 个, 其中仅用 OPI_{10} 一个引物就能产生谱带 11 条, 其中多态性谱带 10 条, 供试的 28 个材料中 15 个自交系 488、3189、掖 107、四自 4、H21、7922、比尖 8、直 25、直 29、P78、501、Z5、145、Mo17、武 314 具有自己独特的 DNA 指纹图谱 (图 1)。增加 OPB_7 引物进行扩增可以将 OPI_{10} 不能区分的自交系 478、5005、黄早 4、吉 853、196、E28、丹 340、81515、获唐黄、52106、167 加以区分, 只有双 105 与双 741 无法通过这两个引物区分开 (图 2)。经过多个引物的扩增发现: OPC_{19} 、 OPG_6 、 OPA_7 、 OPI_{11} 、 OPG_{14} 都能将其分开, 也就是说只需 3 个引物就可以对这 28 个自交系进行鉴别, 为了证实以上的结果本研究进行了多次重复, 得到了完全一致的扩增图谱。以上结果不仅表明所选引物在供试的自交系中表现出较好的多态性, 而且揭示了利用 RAPD 技术进行自交系鉴定的高效性。



M 为分子量标记; CK 为空白对照; 1-28 为自交系 1-28, 其名称见表 1。

图 1 引物 OPI_{10} (ACAACGCGAG) 对 28 个自交系扩增的 RAPD 产物



M 为分子量标记; CK 为空白对照; 1-28 为自交系 1-28, 其名称见表 1。

图 2 引物 OPB_7 (GGTGACGCGAG) 对 28 个自交系扩增的 RAPD 产物

2.2 对亲缘关系很近的自交系的鉴定

478(8112 × 5003)、488(478的S6同代姊妹系)、3189(478的非同代姊妹系)这3个姊妹系用同工酶技术无法区分,而利用RAPD技术只用OPI₁₀一个引物就可以明显的鉴定出来。

双105与双741具有相同的来源是高代姊妹系,遗传基础非常相近,无法通过同工酶、蛋白质的差异进行区分,但用RAPD技术通过引物OPC₁₉, OPC₆, OPA₇, OPI₁₁, OPC₁₄都可以将其区分。

以上的结果表明:自交系间包括亲缘关系很近的材料,只要其DNA序列不同,通过RAPD技术都能产生明显的差异,很容易区分,说明该方法可有效地鉴定玉米自交系的真伪及一致性。

3 讨 论

每种引物扩增的一条谱带代表了被扩增的基因组中的一个遗传位点。虽然每一引物所能检测的DNA多态性区域是有限的,但利用一系列引物可以检测的区域几乎覆盖整个基因组^[2],所以可通过增加引物来鉴定更多的自交系。由于玉米自交系能够通过RAPD扩增得到特征谱带,今后可以建立标准化的玉米自交系DNA指纹图谱,建立数据库,实现计算机对图谱的自动识别来对玉米自交系的真伪和一致性进行鉴定,这将对杂交种的生产、发现和利用自交系变异、保护知识产权有重要意义。

RAPD标记可能会产生非基因组DNA的假带,可通过设置重复和无模板DNA的对照加以排除。RAPD方法对反应条件敏感,稳定性、重复性差,但在操作过程中严格控制实验条件(包括仪器、试剂型号、试剂来源、反应程序等),保证其一致性,是可以得到可靠重复的结果的。同时还要加强对所用引物的筛选,选用能产生明显可辨谱带或异常带较少的引物。所以为了获得RAPD分析的重复可靠的结果,实验条件的标准化、程序化是非常重要的。

本研究所采用的DNA提取方法是郭景伦改进的新方法,该方法从种子的胚中直接提取,不用发芽,不需液氮,操作简单、快速,实用性强,提取的DNA质量好,是玉米品种鉴定的一个理想的DNA提取方法。经过2年多应用RAPD技术对玉米进行研究发现:本实验所选用的这套反应体系和程序扩增结果稳定性、重复性较好。可以预料,随着简便可靠的操作体系的建立,成本的不断降低,检测手段的改进,RAPD方法在大规模自动化的品种鉴定中将具有良好的发展前景。

参 考 文 献

- 1 郭景伦,赵久然.玉米单粒种子DNA提取新方法.北京农业科学,1997,15(2):1-2
- 2 惠东威,陈受宜.RAPD技术及其应用.生物工程进展,1992,12(6):1-5
- 3 刘新芝.RAPD在玉米类群划分研究中的应用.中国农业科学,1997,(3):44-51
- 4 余四斌,徐才国.用RAPD技术鉴定水稻种子纯度初探.种子,1996,(5):56-57
- 5 Hu J. and Quiros C. F. Identification of broccoli and cauliflower cultivars with RAPD markers. Plant Cell Res. 1991, 10: 505-511
- 6 McDonald M. B., et al. DNA extraction from dry seeds for RAPD analysis in varietal identification studies. Seed Sci. Technol. 1994, 22: 171-176
- 7 Welsh J., McClell and M., et al. Fingerprinting genomes using PCR with arbitrary primer. Nucl. Acids. Res. 1990, 18: 7213-7218
- 8 Williams J. G. K., Kubelik A. R., Livak K. J., et al. DNA polymorphisms amplified by arbitrary primers are useful as genetic markers. Nucl. Acids. Res. 1990, 18: 6531-6535